

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **08169891 A**(43) Date of publication of application: **02.07.96**

(51) Int. Cl.

C07F 9/10
A23L 1/076
A23L 1/30
C12P 9/00
// A61K 31/66
A61K 35/64

(21) Application number: **06313874**(22) Date of filing: **19.12.94**(71) Applicant: **API KK**

(72) Inventor: **NONOGAKI TAKASHI**
MISHIMA SATOSHI
HIRASHITA KAYOKO
SAI AKIRA

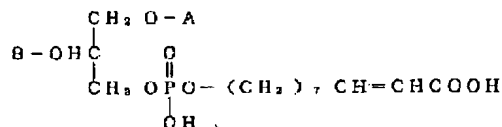
(54) **COMPLEX OF DECENOIC
 ACID-GLYCEROPHOSPHOLIPID, ITS
 PRODUCTION AND FOOD COMPOSITION**

(57) Abstract:

PURPOSE: To obtain the subject new complex, capable of manifesting immunopotentiating effects, having health promoting actions, good in absorbability and useful as a healthy food, etc., by reacting hydroxydecenoic acid with a glycerophospholipid in the presence of a phospholipase.

CONSTITUTION: A new complex of decenoic acid with a glycerophospholipid, represented by the formula (A and B are each H or a 16-22C acyl), capable of manifesting immunopotentiating effects, having high pharmacological activities such as health promoting actions, excellent in absorbability in ingestion as a healthy food and useful as a food composition for the healthy food, etc. The complex of the decenoic acid with the glycerophospholipid is obtained by reacting 10-hydroxydecenoic acid contained in royal jelly with a glycerophospholipid contained in soybeans (e.g. dipalmitoylphosphatidylcholine) in the presence of a phospholipase (e.g. phospholipase D) as an enzyme.

COPYRIGHT: (C)1996,JPO



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-169891

(43) 公開日 平成8年(1996)7月2日

| (51) Int.Cl. ⁶ | 識別記号 | 庁内整理番号 | F I | 技術表示箇所 |
|------------------------------------|------|-----------|-----|--------|
| C 0 7 F 9/10 | | C 9450-4H | | |
| A 2 3 L 1/076 | | | | |
| 1/30 | A | | | |
| | B | | | |
| C 1 2 P 9/00 | | 9359-4B | | |
| 審査請求 有 請求項の数 3 O L (全 11 頁) 最終頁に続く | | | | |

(21) 出願番号 特願平6-313874

(22) 出願日 平成6年(1994)12月19日

(71) 出願人 591045471

アビ株式会社

岐阜県岐阜市加納桜田町1丁目1番地

(72) 発明者 野々垣 孝

岐阜市加納桜田町1丁目1番地 アビ 株式会社内

(72) 発明者 三島 敏

岐阜市加納桜田町1丁目1番地 アビ 株式会社内

(72) 発明者 平下 加代子

岐阜市加納桜田町1丁目1番地 アビ 株式会社内

(74) 代理人 弁理士 恩田 博宣

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 デセン酸・グリセロリン脂質複合体及びその製造方法並びに食品組成物

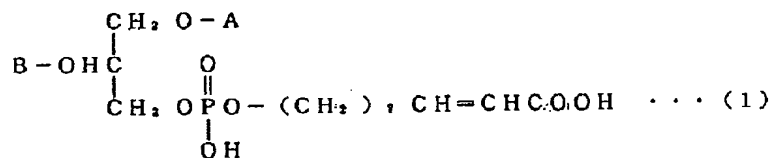
(57) 【要約】

【目的】 免疫賦活効果を発揮でき、健康増進作用などの薬理活性が高く、しかも健康食品として摂取したときの吸収性に優れた新規な化合物及びその製造方法並びに食品組成物を提供する。

【構成】 新規なデセン酸・グリセロリン脂質複合体は、下記一般式(1)で示される化合物である。この複*

* 合体は、ローヤルゼリー中に含まれる10-ヒドロキシデセン酸と、大豆中に含まれるグリセロリン脂質とを、酵素としてのホスホリパーゼDの存在下に反応させることにより得られる。そして、複合体は、錠剤や粉末の形態で、食品組成物として利用される。

【化1】

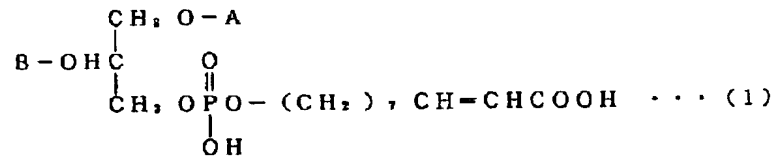


但し、A、Bはそれぞれ水素又は炭素数16～22のア

シル基である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記一般式(1)で示されるデセン酸・*



但し、A、Bはそれぞれ水素又は炭素数16～22のアシル基である。

【請求項2】 ヒドロキシデセン酸とグリセロリン脂質とを、酵素としてのホスホリパーゼの存在下に反応させる請求項1に記載の一般式(1)で示されるデセン酸・グリセロリン脂質複合体の製造方法。

【請求項3】 請求項1に記載のデセン酸・グリセロリン脂質複合体を含有する食品組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】この発明は、健康食品などとして利用される新規なデセン酸・グリセロリン脂質複合体及びその製造方法並びに食品組成物に関するものである。さらに詳細には、ローヤルゼリー中に特異的に存在するヒドロキシデセン酸とグリセロリン脂質とを、ホスホリパーゼにより酵素的に結合させた全く新しいデセン酸・グリセロリン脂質複合体及びその製造方法並びに食品組成物に関するものである。

【0002】

【従来の技術】高齢化社会の到来と共に、いかに病なく過ごせるかが人々の共通の関心事となり、長寿社会になるにつれて増加する成人病や老年病を予防或いは治療させることは大きな社会的課題となっている。そのため、これらの疾患を対象とした薬や健康食品の開発が盛んに行われている。中でも、免疫力を高める食品は、日常摂取することにより、老化防止、感染防止、抗ガン等が期待できることや、医薬と異なり副作用の心配がないことから、ますますその重要性を増している。

【0003】高齢化に伴う免疫機能の低下のみならず、我々の住む環境は近年、文明の発展と共に人体に有害な要素、例えば大気汚染、騒音、ストレス等の増加により、生体の防御能力いわゆる免疫力が低下している。この免疫力の低下は、免疫学の最近の研究によれば、成人病、例えば動脈硬化、心筋梗塞、糖尿病、脳血管障害などの引き金の一つになっている。このような観点から、天然物由来で生体防御機構を強力に賦活する生物学的応答修飾物質(BRM)が着目されており、ローヤルゼリーもこの一つと考えられている。

【0004】ローヤルゼリーとは、王台(蜂の巣中の土台)中に産み付けられた蜂の幼虫の食餌として、働き蜂が分泌するものである。このローヤルゼリーにより育成した幼虫は、その後さなぎの期間を経て、羽化し女王蜂となる。女王蜂の寿命は3～4年で、働き蜂の1～2ヶ

* グリセロリン脂質複合体。

【化1】

月に対して約20倍もの長寿である。さらには、生涯に120万個の卵を産む能力を持ち、ローヤルゼリーは寿命の延長、生殖力の持続、老化防止に寄与しているものと考えられている。

【0005】このローヤルゼリーは古来より食されてきた健康食品であり、滋養強壯の目的で医薬品原料としても用いられている。ローヤルゼリーの薬理作用としては、更年期障害予防作用、抗貧血作用、老化防止、抗放射線作用、抗ガン作用、血流増加作用、抗動脈硬化作用、リウマチ・神経痛予防作用、健康増進作用等数多くの有用な作用があり、臨床的にもその効果は確認されている。しかし、このような個々の薬理作用を示すローヤルゼリー中の有効成分はそれぞれ特定されているわけではない。即ち、ローヤルゼリーは蛋白質、糖質、脂質を主構成成分とし、ビタミン・ミネラル等も含まれるバランスのとれた内容組成であるため、生体に好ましい作用を示すのか、或いはいわゆる「R物質」と呼ばれる特定の未知成分の働きによるのかは判明していない。

【0006】成分と薬理効果の相関が判明しているローヤルゼリーの研究としては、その主成分であるヒドロキシデセン酸の免疫力低下防止作用である(謝卓丘 他、中国薬科大学学報、21巻、167頁、1990年、黄強 他、中国神経精神疾病雑誌、12巻、24頁、1986年、Huang Xiaofeng et al. : KEXUE TONGBA, 30巻、1355頁、1985年)。このヒドロキシデセン酸はローヤルゼリー中から1955年ブテナントにより発見された脂肪酸であり、ローヤルゼリー以外の天然物から見出されておらず、ローヤルゼリー固有の成分である。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、薬理作用を示すヒドロキシデセン酸は、ローヤルゼリー中には2%程度しか含有されていない。このため、ローヤルゼリーそのものを日常摂取してその効果を得るためには、摂取量が多くなりすぎ、実用的ではない。また、ヒドロキシデセン酸単独よりも更に吸収性の高い製剤が得られれば最少量で効率よく作用することから、その改善が広く望まれている。

【0008】この発明は、上記のような従来技術に存在する問題に着目してなされたものである。その目的とするところは、免疫賦活効果を発揮でき、健康増進作用などの薬理活性が高く、しかも健康食品として摂取したときの吸収性に優れた新規な化合物及びその製造方法並び

10

20

30

40

50

に食品組成物を提供することにある。

【0009】

【課題を解決するための手段】この発明は、かかる実状によりなされたものであって、先に本願出願人が特許出願した「機能性食品素材」（特開平3-259049号公報）を更に改良したものである。本発明者らは、ヒドロキシデセン酸の吸収力を向上させ、薬理作用を高めるため、細胞に親和性の高い物質を検索した。そして、グリセロリン脂質がその最も好ましい物質であること、及びグリセロリン脂質がヒドロキシデセン酸を結合させるに好都合なキャリアであり、ヒドロキシデセン酸単独よりも薬理活性が増大することがわかった。さらには、上記「機能性食品素材」中に記載されているグリセライドよりも一層吸収率の高い製法を見出し、この発明を完成させるに至った。

【0010】すなわち、請求項1に記載の発明は、前記一般式(1)で示されるデセン酸・グリセロリン脂質複合体である。また、請求項2に記載の発明では、ヒドロキシデセン酸とグリセロリン脂質とを、酵素としてのホスホリパーゼの存在下に反応させる前記一般式(1)で示されるデセン酸・グリセロリン脂質複合体の製造方法である。

【0011】さらに、請求項3に記載の発明では、請求項1に記載のデセン酸・グリセロリン脂質複合体を含有する食品組成物である。以下に、この発明について詳細に説明する。

【0012】この発明のデセン酸・グリセロリン脂質複合体は、前記一般式(1)で示される新規な化合物である。一般式(1)中、A、Bはそれぞれ水素又は炭素数16~22のアシル基である。このアシル基は通常直鎖状であるが、分岐状であってもよい。また、A、Bにおけるアシル基の炭素数は通常同じであるが、異なってもよい。このデセン酸・グリセロリン脂質複合体は、ローヤルゼリー中に含有されるデセン酸と、大豆や卵黄に含有されるグリセロリン脂質とを、酵素としてのホスホリパーゼの存在下に反応させることにより得られる。

【0013】次に、デセン酸・グリセロリン脂質複合体を得るためのヒドロキシデセン酸は、通常ローヤルゼリーより抽出される10-ヒドロキシデセン酸である。ローヤルゼリーは、生或いは凍結乾燥品のいずれでもよい。ローヤルゼリー中の脂質画分を得るために、食品加工で許容されるエタノールをローヤルゼリーに対し1~100倍量使用することにより、ローヤルゼリー中の10-ヒドロキシデセン酸を含む脂質が抽出される。その後、濾過又は遠心分離後、エタノール溶液を減圧下で濃縮乾固する。出発原料として生ローヤルゼリーを使用する場合には、濃縮乾固物中に糖分がかなり含まれるので、更にエタノールを乾固物に加えて糖などの不溶物を除去しておくともよい。この10-ヒドロキシデセン酸は、免疫賦活効果などの薬理活性を発現する。なお、ヒ

ドロキシデセン酸としては、10-ヒドロキシデセン酸以外ののものであってもよい。

【0014】このヒドロキシデセン酸に富む脂質をそのまま使用してもよいが、更に高純度のヒドロキシデセン酸を得たい場合には、エタノールと水の混液（エタノール濃度が約50~80%）で再結晶すれば純度80%以上のものが効率よく得られる。この脂質にグリセロリン脂質を1~4倍量（重量比）添加し、よく混合した後、水又はカルシウムを含む電解質溶液を加え、必要ならば超音波処理にて均一なエマルジョンとすることが、その後の酵素反応において好ましい。

【0015】次に、デセン酸・グリセロリン脂質複合体を得るためのグリセロリン脂質としては、レシチン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルイノシトール〔以上はいずれも複合体を構成すると、一般式(1)中のA、Bとも炭素数16~22のアシル基である。〕、リゾリン脂質〔複合体を構成すると、一般式(1)中のAが水素、Bが炭素数16~22のアシル基のものは2-アシルグリセロフォスフォコリン、Aが炭素数16~22のアシル基、Bが水素ものは1-アシルグリセロフォスフォコリンである。〕、グリセロフォスフォコリン〔複合体を構成すると、一般式(1)中のA、Bとも水素となる。〕等が挙げられる。

【0016】一般に最も広く使用されるレシチンは、大豆由来又は卵黄由来のものであり、水溶性にしたものや還元したもの或いはリゾレシチンである。このグリセロリン脂質は、人の細胞に親和性の高い物質であり、ヒドロキシデセン酸の吸収力を向上させ、免疫賦活効果などの薬理活性を高めることができる。

【0017】また、ヒドロキシデセン酸とグリセロリン脂質との反応の際に使用される酵素はホスホリパーゼである。このホスホリパーゼの中でも、グリセロリン脂質に対して特異的な酵素の一つであるホスホリパーゼDが好適である。ホスホリパーゼDは、例えばグリセロリン脂質の一つであるホスファチジルコリン（レシチン）のコリン-リン酸エステルを加水分解してホスファチジル酸とコリンを生成する作用をもつ。本酵素には別に、ホスファチジル基転移活性、 $\text{phosphatidyl-O-R} + \text{R}'\text{-OH} \rightarrow \text{phosphatidyl-O-R}' + \text{R-OH}$ もあり（酵素ハンドブック、451頁、首藤ら、Chem Pharm Bull., 36

(1), 209-217, 1988、古賀ら、Lipids, 29(2), 83-89, 1994）、この発明ではこの作用が利用される。

【0018】そして、このホスホリパーゼDをヒドロキシデセン酸1g当たり0.2~200単位添加、溶解し、20~50℃で2~48時間反応させる。ホスホリパーゼDは、その純度を問わず使用でき、その起源としてはキャベツ、ハウレンソウ、ニンジン、ピーナッツ、

綿実等の植物由来のものや放線菌ストレプトマイセス属 (*Streptomyces* sp.)、グラム陰性菌等の微生物由来のものが使用される。

【0019】反応終了後、液状で用いられる場合を除き、反応液をスプレードライ、凍結乾燥、減圧乾燥、加熱乾燥等の手段により乾燥物に仕上げる。酵素を失活させる場合には、反応液を70~90℃で最高30分まで加温することにより達成される。また、反応物をより精製して純度の高いデセン酸・グリセロリン脂質複合体を得たい場合には、乾燥物にエタノールを加え、ろ紙濾過により不溶物を除き、ろ液を上記の適当な手段により乾燥させるか、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより、エタノールと水の混液を移動相とし、デセン酸・グリセロリン脂質複合体を分取してもよい。

【0020】このようにして得られる物質は、油性の高い性状を示し、その後の取り扱いが困難な場合には、でんぶん、乳糖等の賦形剤を乾燥前及び乾燥後の少なくとも一方において添加、混合することにより粉末とされる。

【0021】また、原料のグリセロリン脂質のC₁位〔一般式(1)中の官能基Aの側の炭素〕又はC₂位〔一般式(1)中の官能基Bの側の炭素〕に脂肪酸がエステル結合しているものを使用する場合、生成するデセン酸・グリセロリン脂質複合体は水に溶けにくい。このため、本品を水溶性や懸濁性としたい場合には、ホスホリパーゼA₁ (リゾプス属 *Rhizopus* sp.) によりC₁位、ホスホリパーゼA₂ (大腸菌 *Escherichia coli*, ミコバクテリウム属 *Mycobacterium* sp., 蛇毒・蜂毒由来等) によりC₂位、原料としてリゾレシチンを用いた場合、ホスホリパーゼB (大腸菌 *Escherichia coli*, ペニシリウム属由来等) によりC₁位のそれぞれアシル基を加水分解することにより、水に溶けやすい水酸基とすれば、水溶性に近いデセン酸・グリセロリン脂質複合体が調製される。

【0022】以上のようにして得られるデセン酸・グリセロリン脂質複合体は、体内への吸収性に優れ、免疫賦活効果を発現できるとともに、薬理活性を発揮することができる。薬理活性としては、健康増進作用、老化防止作用、感染防止作用、抗ガン作用、抗貧血作用、抗放射線作用、血流増加作用、抗動脈硬化作用、更年期障害予防作用、リウマチ・神経痛予防作用などが挙げられる。そして、この複合体は、錠剤や粉末の経口食品組成物として利用される。この食品組成物はでんぶんや乳糖を主成分とし、デセン酸・グリセロリン脂質複合体が含有される。食品組成物中のデセン酸・グリセロリン脂質複合体の含有量は、1~50重量%の範囲が好ましく、5~40重量%の範囲がさらに好ましい。この含有量が1重量%未満では、十分な免疫賦活効果が得られず、50重量%を越えても吸収の増加が認められず、かえって経済

的に不利となる。

【0023】

【実施例】以下に、この発明を具体化した実施例、すなわちデセン酸・グリセロリン脂質複合体の製造及び薬理活性について説明する。なお、この発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

(実施例1) ジパルミトイルホスファチジルコリン (フナコシ薬品社製) 50mgと10-ヒドロキシデセン酸 (日本商事社製) 20mgをとり、これにエタノール50mlを添加してよく攪拌した。次いで、40℃で減圧乾固した。これに10mMの塩化カルシウムを含む水50mlを加え、ホスホリパーゼD (ストレプトマイセス属由来、3000単位/mg、シグマ社製) 4単位を添加し、37℃で24時間反応させた。反応液に酢酸エチル50mlを加え、振り混ぜて酢酸エチルを減圧下に濃縮した。

【0024】その一部をヘキサン、酢酸エチル、酢酸 (重量比で1:1:0.01) を展開溶媒として薄層クロマトグラフィー (シリカゲルプレートKF254, メルク社製) にて各成分を分離した。そのチャートを図1に示した。そして、図1中の(3)のスポット (R_f 値 0.7~0.8付近) をかきとり、酢酸エチル10mlを加え、50℃で30分間溶出させた。遠心分離後の液を減圧乾固し、これをNMR (核磁気共鳴スペクトル) により分析した。その結果を図2に示した。

【0025】これにより、デセン酸の10位のヒドロキシル基が反応して、ジパルミトイルホスファチジルデセン酸〔一般式(1)中のA, Bともに炭素数16のアシル基〕が生成されたことを確認した。なお、図1中の(1)、(2)、(4)のスポットについても同様に示した。その結果、図3のNMRチャートに示したように、スポット(2)は未反応の10-ヒドロキシデセン酸であった。また、図示しないが、スポット(1)は未反応のジパルミトイルホスファチジルコリン、スポット(4)は分解物としてのホスファチジン酸であった。

(実施例2) ジオレイルホスファチジルコリン (フナコシ薬品社製) 50mgと10-ヒドロキシデセン酸 (日本商事社製) 20mgをとり、以下実施例1と同様に操作し、反応生成物を得た。この反応生成物について、NMRにより分析を行った。そのNMRチャートを図4に示した。その結果、デセン酸の10位のヒドロキシル基が反応して、ジオレイルホスファチジルデセン酸〔一般式(1)中のA, Bともに炭素数18のアシル基〕が生成されたことを確認した。

(実施例3) ホスファチジルコリン (C₁位はパルミトイル、C₂位はドコサヘキサノイル) 50mgを用い、以下実施例1と同様に操作し、反応生成物を得た。この反応生成物について、NMRにより分析を行った。そのNMRチャートを図5に示した。その結果、デセン酸の10位のヒドロキシル基が反応して、ジアシルホスファチジルデセン酸〔一般式(1)中のAが炭素数18のアシ

ル基、Bが炭素数22のアシル基]が生成されたことを確認した。

【実施例4】乾燥ローヤルゼリー（10-ヒドロキシデセン酸5.6%含有）100gにエタノール500mlを加え、30分間攪拌し、その後珪藻土（100メッシュ）50gを加えて濾過した。ろ液を40℃で減圧乾固し、15gの油状物を得た。別に、50gの大豆レシチン〔ツル-レシチン工業（株）製〕をエタノール100mlに溶解させ、先の油状物に加え、再び減圧乾固した。

【0026】乾固物に水100mlを加え、10分間超音波処理し、エマルジョンとなした。これにホスホリパーゼD（キャベツ由来、1000単位/mg、シグマ社製）6000単位を加え、37℃で24時間反応させた。その後、凍結乾燥し64gの固形物を得た。このもののデセン酸・レシチン複合体量を高速液状クロマトグラフィー〔担体：逆相オクタデシルシラン、移動相：メタノール・水（44：56）3.5リットル+リン酸20.18g+リン酸ナトリウム21g〕にて定量したところ、全体のヒドロキシデセン酸の30%がレシチンと複合体を形成した。

【実施例5】生ローヤルゼリー（10-ヒドロキシデセン酸2.2%含有）1Kgにエタノール5リットルを加え、充分に攪拌し、3000回転で15分間遠心分離し、上清を得た。これに珪藻土（100メッシュ）200gを加え、濾過し、40℃で減圧乾固した。この乾固物に更にエタノールを1リットル加えて、不溶物をろ紙で濾過し除去した。このエタノール溶液に、卵黄レシチン100gを加え、よく懸濁させ、減圧下で乾固した。

【0027】10mMの塩化カルシウムを含む水1リットルを加え、次いでホスホリパーゼD（ストレプトマイセス属、3000単位/mg、シグマ社製）3000単位を添加し、40℃で30時間反応させた。90℃で30分間加温して酵素を失活させた後、凍結乾燥し、固形物150gを得た。デセン酸・レシチン複合体量を実施例1と同様に定量したところ、全体の35%のヒドロキシデセン酸がレシチンと複合体を形成した。

【実施例6】実施例4と同様に、乾燥ローヤルゼリー100gから15gの油状物を得た。このものをエタノール：水（重量比で1：1）で再結晶し、5.6gの結晶を得た（ヒドロキシデセン酸4.8g）。

【0028】このものに、リゾレシチン〔複合体を構成すると、一般式（1）中のAは炭素数16～22のアシル基、Bは水素となる。フナコシ薬品社製〕15g及びエタノール50mlを加え、50℃に加温して均一に溶解後、40℃で減圧乾固した。乾固物に水50mlを加え、5分間超音波処理してエマルジョンとなし、ホスホリパーゼD〔キャベツ由来、1500単位/mg、アピ（株）製〕1000単位を添加し、37℃で40時間反応させた。反応物中の複合体量は6.5gであり、ヒドロキシデセン酸の34%がリゾレシチンと複合体を形成した。

〔キャベツ由来ホスホリパーゼDの調製〕新鮮なキャベツ10Kgを包丁で細片とし、冷水50リットルを加え、ミキサーでホモジネートとした。このものをガーゼでこし、そのろ液を3000回転で30分間遠心分離した。上清をとり、これに珪藻土（600メッシュ）を加えて濾過した。ろ液を4℃に保ち、限外濾過モジュール（分子量カット：6000、旭化成社製）で脱塩濃縮し、低分子成分を除去した。ホスホリパーゼDを含む溶液（限外濾過内液）をとり、再び珪藻土を加え濾過し、得られた清澄なる液45リットルに対し冷エタノールを40リットルを攪拌しながら添加し、ホスホリパーゼDを沈澱させた。この沈澱を採取し、減圧乾燥させて、粗ホスホリパーゼD粉末150gを得た。このもののホスホリパーゼD活性は1500単位/mgであった。

【実施例7】実施例4で得たデセン酸・グリセロリン脂質複合体5gをとり、水100mlを添加し超音波で10分間処理して懸濁液となした。これにホスホリパーゼA₂（蜂毒 Bee venom 由来、800単位/mg、シグマ社製）を1500単位添加し、37℃で10時間激しく攪拌しながら反応させた。反応終了後、溶液の濁りは殆どなくなり、ろ紙濾過して水溶性の反応物を得た。このものの乾燥後の重量は2.8gであった。この実施例では、C₂位におけるアシル基が加水分解された。

【実施例8】乾燥ローヤルゼリー（10-ヒドロキシデセン酸6.0%含有）1Kgにエタノール5リットルを加え、1時間攪拌し、その後珪藻土（100メッシュ）で濾過した。ろ液を40%で減圧乾固し、180gの油状物を得た。このものにエタノール200mlを加え50℃で良く攪拌溶解し、次いで水100mlを徐々に加え、更に温度を60℃まで上昇させ熱時濾過した。ろ液を4℃の冷蔵庫でゆっくり冷却させ、ヒドロキシデセン酸を含む結晶65gを得た（10-ヒドロキシデセン酸の純度82%）。

【0029】このものをエタノール200mlに溶解させ、大豆水溶性レシチン〔ツル-レシチン工業（株）製〕250gを加え懸濁させた。更に、水50mlを加え、50℃で約50mlとなるまで減圧濃縮したのち、ホスホリパーゼD〔キャベツ由来、1500単位/mg、アピ（株）製〕5000単位を加え、37℃で48時間反応させた。このものを凍結乾燥し、310gの固形物を得た。デセン酸・レシチン複合体量を測定したところ、全体の40%のヒドロキシデセン酸がレシチンと複合体を形成した。

【実施例9】実施例6で得られたデセン酸・リゾレシチン複合体5gに乳糖15gを加え、よく攪拌して均一な粉末とした。更に、バレイショデンプン10gを加え、混合した後300mgずつを硬カプセルに充填し、デセン酸・リゾレシチン複合体製品を調製した。

【実施例10】乾燥ローヤルゼリー1Kgを用い、実施例4と同様の方法で調製したデセン酸・レシチン複合体5

00gに、グリセリン脂肪酸エステル240g、60%ビタミンE50mg、サフラワー油2000gを加えて混合し、ゼラチンソフトカプセルに300mgずつ充填し、デセン酸・レシチン複合体製品を調製した。

(実施例11) 実施例5で得られたデセン酸・レシチン複合体100gに乳糖100g及びコーンスターチ20gを加え、攪拌後手製打錠機で一錠当たり300mgの錠剤を試作した。

(試験例1) 実施例7で得られた複合体1gをシリカゲルクロマトグラフィー〔展開媒体：ヘキサン：酢酸エチル（重量比で1：1）〕でデセン酸・レシチン複合体を分離した。本品につき、以下のように動物細胞実験を行*

* った。

1. マウスマクロファージにおけるTNF産生誘導活性への効果

C3H/Heマウスにグリコーゲンを腹腔内に投与し、マクロファージの培養系を作製した。このマクロファージを各検体の試液と2時間培養させた後、培養上清中のTNF産生量を調べた。その結果を表1に示した。なお、TNFの活性測定はL-929細胞傷害試験により行った。

【0030】

【表1】

| 検体 | 項目 | 投与量 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) | TNF活性 (ユニット/ml) | | | 平均値 |
|--------------------------|----|------------------------------------|--------------------|------|------|------|
| コントロール | | — | 0.02 | 0.05 | 0.01 | 0.03 |
| ヒドロキシ デセン酸 | | 0.01 | 0.07 | 0.01 | 0.01 | 0.03 |
| | | 0.1 | 0.09 | 0.06 | 0.03 | 0.06 |
| | | 1.0 | 0.11 | 0.15 | 0.08 | 0.11 |
| | | 10 | 0.25 | 0.33 | 0.42 | 0.33 |
| デセン酸・ グリセロリン 脂質複合体 | | 0.01 | 0.08 | 0.04 | 0.05 | 0.06 |
| | | 0.1 | 0.13 | 0.11 | 0.12 | 0.12 |
| | | 1.0 | 0.36 | 0.41 | 0.45 | 0.41 |
| | | 10 | 0.95 | 0.99 | 0.84 | 0.93 |

【0031】表1から明かなように、10-ヒドロキシデセン酸（以下HDAと略す）が弱いTNF活性を示したのに対し、デセン酸・グリセロリン脂質複合体（以下L-HDAと略す）は各濃度において、いずれも高いTNF活性を示した。なお、表には示さないが、レシチンは0.01~10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度においてコントロールとの差異は認められなかった。

2. マウスの抗体産生能への効果

各検体は、連日4日間ICRマウスに対し、1日1回、1mlの1%HCO-60（カストロオイルハイドロゲネ※

※レート）水溶液を胃ゾンデで強制経口投与した。4日目に各マウスに0.1mlのSRBC（羊赤血球）溶液を腹腔内に投与し、引続き前日と同様な量で、連日3日間の強制経口投与した。実験開始から8日目に頸椎脱臼により致死せしめ、脾臓の重量及び血清中抗体量を測定した。その結果を表2に示した。なお、血清中抗体量のA₅₄₀は、10ml当たりの540nmにおける吸光度を表す。

【0032】

【表2】

| | 投与量 (mg/20gマウス) | 脾臓重量 (mg/20gマウス) | 血清中抗体量 A ₅₄₀ |
|------------|--------------------|---------------------|----------------------------|
| コントロール | — | 122.0 ± 7.80 | 30.5 ± 8.6 |
| カゼイン | 36.8 | 110.9 ± 10.4 | 54.2 ± 5.7 |
| レシチン | 8 | 130.5 ± 12.0 | 35.8 ± 6.5 |
| HDA | 2 | 163.1 ± 17.4 | 60.8 ± 3.8 |
| HDA + レシチン | 2 + 8 | 160.3 ± 15.5 | 58.3 ± 6.2 |
| L-HDA | 10 (HDAとレシチン) | 186.3 ± 9.3 | 69.4 ± 5.6 |

【0033】表2に示したように、HDA群は、コントロールに対し、脾臓の重量が増加し、抗体産出能の上昇が認められ、L-HDA群はその効果がさらに上昇し

た。

3. ストレスによる抗体産出能低下への効果

各検体は、連日1週間ICRマウスに対し、1日1回、

1mlの1% HCOの水溶液を胃ゾンデで強制経口投与した。8日目に各マウスに対し、拘束法によりストレスを強制的に与える。5日目に0.1mlのSRBC溶液を腹腔内に投与し、引続きマウスに対し、試験開始と同様な各検体の量で、連日4日間強制経口投与した。実験開始から8日目に頸椎脱臼により致死せしめ、脾臓の重量及*

* び血清中抗体量を測定した。その結果を表3に示した。なお、ストレス付与開始前における血清中抗体量は 28.64 ± 5.9 であった。

【0034】

【表3】

| 検体 | 項目 | 投与量 (mg/20gマウス) | 脾臓重量 (mg/20gマウス) | 血清中抗体量 A ₄₀₀ |
|------------|----|--------------------|---------------------|----------------------------|
| コントロール | | — | 108.30±4.98 | 14.32±3.6 |
| レシチン | | 8 | 105.30±8.70 | 14.20±2.6 |
| HDA | | 2 | 111.28±10.3 | 15.61±1.3 |
| HDA + レシチン | | 2 + 8 | 112.3 ± 11.2 | 16.6 ± 2.5 |
| L-HDA | | 10 (HDAとし72) | 121.36±5.91 | 25.30±4.6 |

【0035】表3に示したように、拘束法によりストレスを強制的に与えることにより、マウスの抗体産出能が明かに低下した。しかし、L-HDAあるいはHDAを投与することにより、マウスの抗体産出能が正常にもど

4. 固型腫瘍 (Sarcoma-180) に対する腫瘍増殖抑制への効果

各検体は、Sarcoma-180 5×10⁶ 個の腫※

※ 瘍細胞移植したICRマウスに対し、翌日より連日10日間1日1回、1mlの1% HOC水溶液を胃ゾンデで強制経口投与した。10日目に0.1mlのSRBC溶液を腹腔内に投与した。翌日引続き前日と同様な各検体の量で、連日4日間強制投与した。腫瘍細胞移植後14日目に頸椎脱臼により致死せしめ、腫瘍重量、脾臓重量及び血清中抗体量を測定した。その結果を表4に示した。

【0036】

【表4】

| 検体 | 項目 | 投与量 (mg/20gマウス) | 腫瘍重量 (mg/20gマウス) | 脾臓重量 (mg/20gマウス) | 血清中抗体量 A ₄₀₀ |
|------------|----|--------------------|---------------------|---------------------|----------------------------|
| コントロール | | — | 2.91±1.3 | 136±9.4 | 9.4±2.3 |
| レシチン | | 8 | 2.56±0.3 | 138±6.7 | 10.1±3.2 |
| HDA | | 2 | 1.51±0.6 | 159±8.5 | 12.6±1.8 |
| HDA + レシチン | | 2 + 8 | 1.35±0.2 | 153±5.5 | 12.1±1.0 |
| L-HDA | | 10 (HDAとし72) | 1.38±0.8 | 179±10 | 18.5±4.0 |

【0037】表4に示したように、コントロールに対し、HDA群及びL-HDA群の腫瘍の重量がコントロールのそれより低くなり、腫瘍増殖抑制効果が認められた。とくに、本検体群に最も高い抗腫瘍効果が認められた。また、これらの投与により、マウスの抗体産出能も

5. 高コレステロール血症への効果

正常ウサギにコレステロール食を7週間連日摂取させ、

この間毎日1回各検体を投与した。1週間ごとに耳静脈より約2mlを採血し、血清を分離後、血清中の総コレステロール、リン脂質、トリグリセライド、β-リポタンパク、遊離脂肪酸及び総脂質量の測定を行った。それらの測定値を表5及び表6に示した。

【0038】

【表5】

| 週 | サンプル | 血清脂質組成 (mg/dl) | | |
|---|--------|----------------|----------|----------|
| | | 総コレステロール | リン脂質 | トリグリセライド |
| 0 | コントロール | 78±11 | 115±20 | 60±18 |
| | レシチン | 76±8 | 112±13 | 70±6 |
| | HDA | 85±18 | 108±18 | 79±10 |
| | L-HDA | 72±10 | 125±18 | 76±8 |
| 4 | コントロール | 1328±100 | 393±36 | 132±10 |
| | レシチン | 1250±110 | 380±41 | 125±8 |
| | HDA | 1126±86 | 380±56 | 113±13 |
| | L-HDA | 1038±112 | 369±69 | 111±8 |
| 5 | コントロール | 1400±115 | 416±45 | 102±15 |
| | レシチン | 1300±120 | 402±53 | 100±15 |
| | HDA | 1138±91 | 386±54 | 101±8 |
| | L-HDA | 1050±96 | 380±85 | 94±13 |
| 6 | コントロール | 1693±115 | 552±56 | 169±21 |
| | レシチン | 1500±156 | 501±66 | 158±16 |
| | HDA | 1289±135 | 462±66 | 133±19 |
| | L-HDA | 1149±102 | 478±78 | 160±22 |
| 7 | コントロール | 1750±136 | 1320±100 | 139±10 |
| | レシチン | 1550±135 | 1350±121 | 148±15 |
| | HDA | 1319±121 | 1320±100 | 129±18 |
| | L-HDA | 1240±100 | 1326±100 | 120±16 |

【0039】

20 【表6】

| 週 | サンプル | 血清脂質組成 (mg/dl) | | |
|---|--------|----------------|-----------------|----------|
| | | 遊離脂肪酸 | β -リポタンパク | 総脂質量 |
| 0 | コントロール | 21.9±3.8 | — | 326±23 |
| | レシチン | 22.0±3.6 | — | 308±50 |
| | HDA | 18.4±7.6 | — | 263±53 |
| | L-HDA | 21.5±5.2 | — | 286±45 |
| 4 | コントロール | 36.2±2.6 | 700±32 | 1896±200 |
| | レシチン | 29.1±4.3 | 720±83 | 1920±106 |
| | HDA | 22.5±3.8 | 751±49 | 1785±120 |
| | L-HDA | 25.3±5.6 | 675±96 | 1851±103 |
| 5 | コントロール | 39.5±8.6 | 1623±120 | 1906±313 |
| | レシチン | 35.5±9.7 | 1650±125 | 1950±151 |
| | HDA | 29.4±1.0 | 1500±121 | 1882±104 |
| | L-HDA | 42.3±8.2 | 1653±110 | 1826±212 |
| 6 | コントロール | 41.6±7.2 | 1785±96 | 2336±132 |
| | レシチン | 39.9±6.4 | 1790±101 | 2020±180 |
| | HDA | 28.8±3.2 | 1653±125 | 1826±209 |
| | L-HDA | 30.6±9.9 | 1700±109 | 1912±117 |
| 7 | コントロール | 25.8±10 | 1689±102 | 2584±200 |
| | レシチン | 26.6±6.1 | 1650±98 | 2260±203 |
| | HDA | 25.0±2.0 | 1368±220 | 1379±98 |
| | L-HDA | 28.1±8.2 | 1503±79 | 1856±185 |

【0040】表5及び表6に示したように、コレストロール食を摂取させることにより、血中コレストロールレベルは急激に上昇し、7週間目には平常の約20倍の増加を示した。それに対し、検体を投与した群は対照群と比較して、血清コレステロールレベルはゆるやかな上昇を示し、投与7週間目では有意に低下することを認めた。また、血清脂質成分のうち総コレストロールにおいては、7週間目において有意な減少が認められた。これはL-HDAの投与により血中コレストロール濃度の増加が抑制されたものと考えられる。

【0041】なお、請求項以外の技術的思想につき、そ

40 の効果とともに以下に記載する。

(1) ホスホリパーゼは、ホスホリパーゼDである請求項2に記載のデセン酸・グリセロリン脂質複合体の製造方法。この方法によれば、一般式(1)で示される新規なデセン酸・グリセロリン脂質複合体を容易に、しかも確実に得ることができる。

(2) グリセロリン脂質はレシチンである請求項2に記載のデセン酸・グリセロリン脂質複合体の製造方法。この方法に従えば、デセン酸・グリセロリン脂質複合体を容易に得ることができる。

(3) ヒドロキシデセン酸が10-ヒドロキシデセン酸

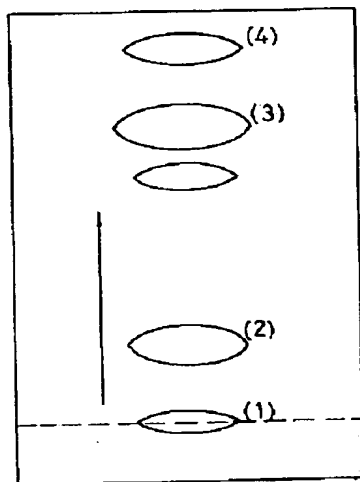
50

である請求項2に記載のデセン酸・グリセロリン脂質複合体の製造方法。この構成により、ローヤルゼリー中の有効成分を利用して薬理効果を発現できるデセン酸・グリセロリン脂質複合体を容易に得ることができる。

【0042】

【発明の効果】以上詳述したように、請求項1に記載の発明によれば、免疫賦活効果を発揮でき、健康増進作用などの薬理活性が高く、しかも健康食品として摂取したときの吸収性に優れている。また、請求項2に記載の発明によれば、新規なデセン酸・グリセロリン脂質複合体を容易に、しかも効率良く得ることができる。さらに、請求項3に記載の発明によれば、免疫賦活効果を発揮で

【図1】



きるとともに、薬理活性が高く、かつ健康食品として摂取したときの吸収性に優れた食品組成物として好適である。

【図面の簡単な説明】

【図1】 実施例1の化合物を示す薄層クロマトグラフィーのチャート。

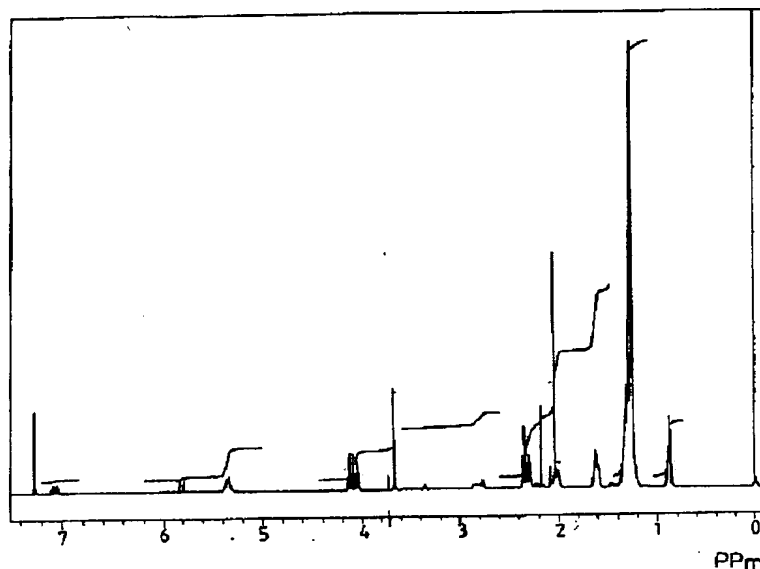
【図2】 実施例1の複合体を示すNMRのチャート。

【図3】 10-ヒドロキシデセン酸を示すNMRのチャート。

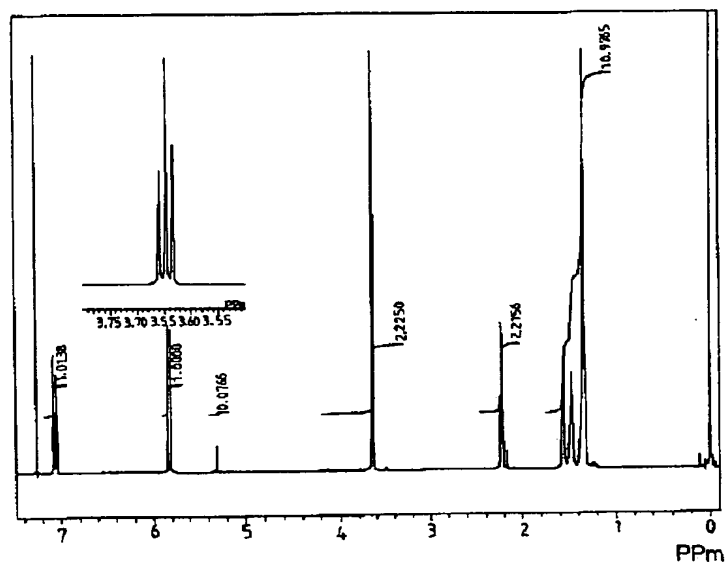
10 【図4】 実施例2の複合体を示すNMRのチャート。

【図5】 実施例3の複合体を示すNMRのチャート。

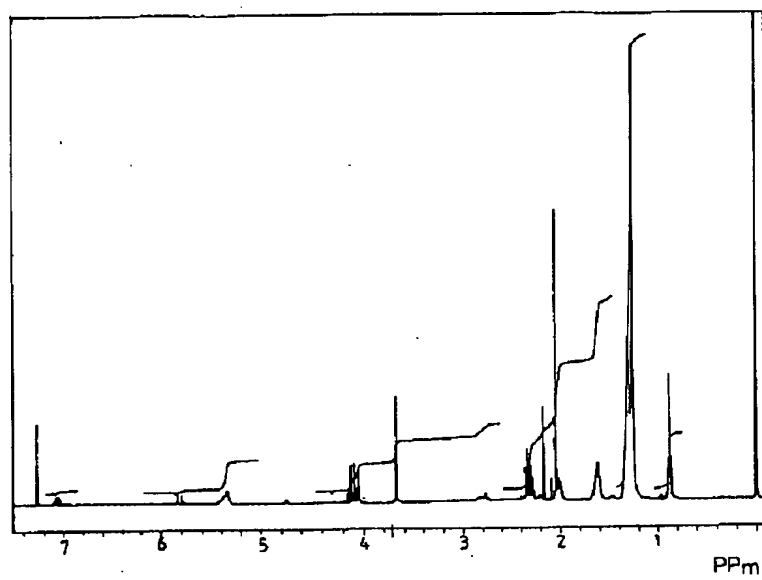
【図2】



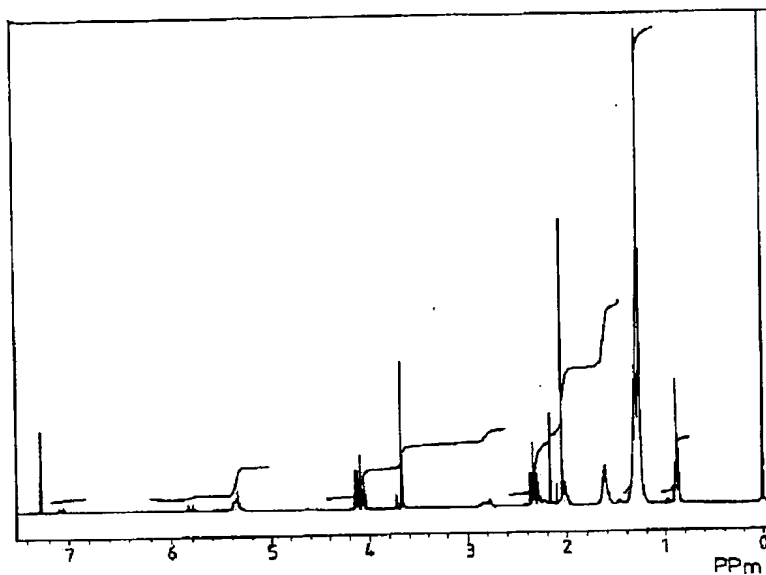
【図3】



【図4】



【図5】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶

// A 6 1 K 31/66
35/64

識別記号

A D U

A B D

庁内整理番号

7431-4C

F I

技術表示箇所

(72)発明者 蔡 陽

岐阜市加納桜田町1丁目1番地 アピ 株
式会社内